

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Ekaterina Kukleva

STANOVENÍ ORGANICKÝCH KYSELIN V PIVU
METODOU HPLC

Determination of Organic Acids in Beer
by HPLC method

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Zuzana Bosáková, Csc.

Konzultant: RNDr. Jana Olšovská, Ph.D.

Praha 2013

Tato bakalářská práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru
MSM0021620857.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 30. května 2013

Kukleva Ekaterina

Poděkování

Chtěla bych především poděkovat RNDr. Janě Olšovské, Ph.D. za trpělivost, odborné vedení, cenné rady, připomínky a veškerou pomoc, kterou mi poskytla při vypracování mé bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Marii Jurkové, CSc., za další hodnotné rady, které mi při vedení mé práce poskytla, Renatě Hakenové za pomoc a podporu a dalším pracovníkům Výzkumného ústavu pivovarského a sladařského, a.s. Také bych chtěla poděkovat Doc. RNDr. Zuzaně Bosákové, PhD. za to, že po celou dobu mého bakalářského studia podporovala můj zájem o praktické zkušenosti a zprostředkovala mi kontakt do laboratoře VÚPS, a.s. Děkuji také své rodině za umožnění studia na vysoké škole a za podporu během celého studia a svým přátelům za celkovou morální podporu.

Abstrakt

Cílem této bakalářské práce je vyvinout a optimalizovat metodu stanovení organických kyselin v pivu metodou HPLC s RI a nebo UV detekcí a ověřit ji na reálných vzorcích. Pivo je složitý matriční vzorek, který vyžaduje před analýzou úpravu, a to pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Pro extrakci byly zvoleny a porovnávány dvě SPE kolonky: Algient Bond-Elute SAX (SAX) a Supelco ENVI-Carb (CB). Sorbenty obou kolon se liší v hlavním principu extrakce, zatímco na SAX kolonce budou zadržovány anionty kyselin a interferující nepolární látky projdou kolonou bez zadržky, na kolonce CB by měl separační mechanismus probíhat přesně obráceně, interferující látky budou zadržovány a anionty analyzovaných kyselin projdou sorbentem bez zadržky. Výtěžnost extrakce organických kyselin z piva byla pro SAX kolonu 80 – 110% a pro CB kolonu 20-50 %.

Stanovení šesti organických kyselin, jmenovitě citronové, jablečné, jantarové, mléčné, octové a šťavelové, se po extrakci s provádělo metodou HPLC na chromatografické koloně Eurokat H (Knauer) 0,01 N kyselinou sírovou jako mobilní fáze. Čas analýzy byl 25 minut. Byly použity a porovnány dva detekční systémy: refraktometrická (RI) a ultrafialová (UV) detekce. Rozlišení separovaných píků se pohybovalo v rozmezí 1,1 – 1,8 pro RI detektor a 1,1 – 1,6 pro UV detektor.

Klíčová slova:

HPLC, organické kyseliny, pivo, SPE.

Abstract

Optimization and validation of HPLC method with RI or UV detection system for determination of six major organic acids in beer was made.

Beer is very complicated matrix, therefore, the samples needs pretreatment using SPE. For solid phase extraction Algient Bond-Elute SAX (SAX) and Supelco ENVI-Carb (CB) cartridges were used and compared. Differences between those two cartridges is in their principle of pretreatment. While on SAX cartridge dissociated organic acid ions will be retained and interfere substances not, on CB cartridge interfering carbohydrates will be retained instead of organic acid ions, which will get through sorbent. Recoveries for organic acids on SAX and CB cartridges were 80 – 110 % and 20 – 50 %, respectively.

For determination of six organic acids, by name citric, malic, succinic, lactic, acetic and oxalic, Eurokat H (Knauer) HPLC column was used with 0.01 N sulfuric acid as a mobile phase. Time of analysis was 25 minutes per sample. Organic acid ions were detected using Refractive Index (RI) and Ultraviolet (UV) detectors. Peak resolution was 1,2 – 1,8 and 1,1 – 1,6 for RI and UV detection, respectively.

Keywords:

HPLC, organic acids, beer, SPE.

Obsah

1.	Seznám zkratk a symbolu	8
2.	Cíl práce	10
3.	Teoretická část	11
3.1.	Vznik organických kyselin	11
3.2.	Množství organických kyselin v pivu	12
3.3.	Vliv organických kyselin na potraviny	12
3.4.	Fyzikálně-chemické vlastnosti organických kyselin	14
3.5.	Analýza organických kyselin	15
3.5.1.	Historické metody	15
3.5.2.	Elektrochemické metody	16
3.5.3.	Spektrofotometrické metody	16
3.5.4.	Enzymatické metody	17
3.5.5.	Chromatografické metody	17
3.5.5.1.	Plynová chromatografie GC	17
3.5.5.2.	Iontová chromatografie IC	18
3.5.5.3.	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie HPLC	18
3.6.	Úpravy vzorku před analýzou	21
4.	Experimentální část	23
4.1.	Použité chemikálie	23
4.2.	Použitá aparatura	23
4.3.	Další použitá zařízení	24
4.4.	Příprava roztoků a vzorků	24
4.4.1.	Standardní roztoky	24
4.4.1.1.	Organické kyseliny	24
4.4.1.2.	Sacharidy	25
4.4.1.3.	Směsný standard s glukosou	25
4.4.2.	Příprava roztoku pro standardní přídavek	26
4.4.3.	Příprava reálných vzorků	26
4.5.	Pracovní postup	26
4.5.1.	SPE – extrakce na pevné fázi	26
4.5.2.	HPLC analýza	27
4.5.3.	Detekce	27

5.	Výsledky a diskuze	28
5.1.	Optimalizace chromatografických podmínek	28
5.1.1.	Výběr stacionární fáze	28
5.1.2.	Optimalizace mobilní fáze	28
5.1.3.	Optimalizace teploty separační kolony	29
5.1.4.	Výběr vlnové délky	29
5.2.	Chromatografické podmínky	29
5.3.	Test vhodnosti chromatografického systému	29
5.4.	Optimalizace extrakčních podmínek	31
5.4.1.	Extrakce na anexu (SAX)	32
5.4.2.	Extrakce na nepolárním sorbentu (ENVI Carb (CB))	34
5.5.	Porovnání výsledků extrakce	34
5.6.	Linearita, limity detekce a stanovitelnosti (LOD a LOQ)	35
5.7.	Stanovení organických kyselin v pivu	37
6.	Závěr	39
7.	Bibliografické citace	40

1. Seznám zkratk a symbolů

A	faktor symetrie píku
BCh	biochemie
C-18	chemicky vázaná oktadecylová stacionární fáze
CB	kolonka ENVI-Carb, Supelco
CD	konduktometrická detekce
CE	kapilární elektroforéza
c _{RI}	lineární rozsah koncentrací organických kyselin pro RI detekci
c _{UV}	lineární rozsah koncentrací organických kyselin pro UV detekci
FID	plamenově ionizační detektor
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC	iontová chromatografie
LL	extrakce kapalina-kapalina
LOD	limit detekce
LOQ	limit stanovitelnosti
M	molekulová hmotnost
MF	mobilní fáze
MS	hmotnostní spektrometrie
N	poměr valového množství látky a objemu roztoku. Val je jeden mol chemických ekvivalentu atomu vodíku
N _s	počet teoretických pater
NP	normální fáze
PC	papírová chromatografie
pK _A	disociační konstanta
R	korelační koeficient
R _{1,2}	rozdělení dvou píků
RI	refraktometrie
RP	obracená fáze
RSD	relativní směrodatná odchylka
SAX	silný aniontový iontoměníč

SF	stacionární fáze
SPE	extrakce ne pevní fázi
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
t_R	retenční čas
T_s	teplota sublimace
T_t	teplota tání
T_v	teplota varu
UV-VIS	ultrafialová a viditelná oblasti světla

2. Cíl práce

Cílem této práce bylo vyvinout rychlou a efektivní metodu stanovení organických kyselin jmenovitě citronové, octové, šťavelové, mléčné, jablečné a jantarové v pivu pomocí stávajícího laboratorního zařízení (HPLC-RI/UV) s jednoduchou přípravou vzorků.

Tato metoda bude využita v rozsáhlé studii charakterizace markerů českého piva. Západoevropská piva chutnají kyseleji a mají nižší pH v porovnání s pivy českými. Existuje předpoklad, že je to způsobeno vyšším obsahem organických kyselin. K ověření tohoto předpokladu bude sloužit metoda vyvinutá v této práci. Výsledné porovnání není součástí této práce, protože se jedná o dlouhodobou studii.

Dalším významným výstupem z této práce je metoda stanovení kyseliny šťavelové, jejíž koncentrace v pivu je důležitým technologickým parametrem, neboť její zvýšené koncentrace způsobují zákal piva.

3. Teoretická část

Organické kyseliny jsou velmi známé chemické sloučeniny, které jsou obsaženy v různé míře v mnoha potravinách a nápojích. Nejběžnější kyselinou je kyselina citronová, která se ve velké míře nachází v citrusových plodech a kyselina octová, která je obsažena zejména v kvasícím ovoci jako následný fermentační produkt přeměny sacharidů.

Z biochemického pohledu studované organické kyseliny hrají zásadní roli v citrátovém cyklu.

3.1. Vznik organických kyselin

Organické kyseliny v potravinách a nápojích pocházejí především z biochemických procesů, jako Krebsův cyklus, nebo jsou produktem činnosti mikroorganismů, jako je kvašení a fermentace (například fermentace sacharidů), nebo mohou být do potravin dodávány při výrobě jako regulátory kyselosti, stabilizátory nebo konzervanty [1, 2]. Organické kyseliny také vznikají jako vedlejší produkty různých průmyslových technologií, kde se používají jako indikátory správnosti procesů nebo kontrola kvality [2].

Organické kyseliny jsou také intermediáty nebo produkty degradace aminokyselin, tuků, uhlovodíků a jejich derivátů. Některé lidské nemoci související s poruchami metabolismu jsou charakterizovány akumulací různých metabolitů včetně organických kyselin. Proto tyto látky často slouží k diagnostice těchto metabolických nemocí, mezi které patří i choroby způsobené genetickými mutacemi [2].

Pivo obsahuje velké množství různorodých organických kyselin, včetně těkavých a netěkavých kyselin, aromatických kyselin a krátkých mastných kyselin. Tyto kyseliny jsou intermediáty nebo vedlejší produkty metabolismu pivovarských kvasnic. Kyseliny jsou produkovány spolu s ethanolem, oxidem uhličitým a glycerolem při metabolismu maltózy a glukózy [1, 3].

Netěkavé kyseliny včetně oxokyselin, jako pyruvát a alfa-oxoglutarát, jsou sekretovány kvasinkami v jejich redukované formě v podobě laktátu a 2-hydroxyglutarátu [1]. Jablečná kyselina je produktem karboxylace pyruvátu, jantarová kyselina je výsledným produktem redukce oxalactátu v citrátovém cyklu. Octová kyselina především vzniká při hydrolýze acetylCoA.

Kyselina citronová vzniká kvašením sacharózy.

3.2. Množství organických kyselin v pivu

Nalezená množství organických kyselin jsou velmi odlišné v závislosti na druhu potravin. Očekávaná množství organických kyselin v pivu se liší v závislosti na zemi původu nápoje. Tato práce byla založena na postupu uvedeném v MEBAKu [4], ale orientační hodnoty, které udává autor, odpovídají spíše hodnotám získaných analýzou německých piv. Odlišnost obsahu kyselin v pivě v závislosti na země původu je znázorněna v tab. 1.

Tab. 1.: Nalezená množství sudovaných organických kyselin.

Kyselina	Množství ¹ [mg/l]	Množství ² [mg/l]
Citronová	10 – 20	200 – 730 / 410 – 650
Jablečná	50 – 100	210 – 280 / 410 – 720
Jantarová	50 – 150	60 – 80
Mléčná	25 – 310	320 – 630
Octová	> 100	50 – 60
Šťavelová	10 – 20	NA

1 – hodnoty z laboratoře v Německu [4], 2 – hodnoty z laboratoře v Thajsku [5]. NA – nebyly stanoveny

3.3. Vliv organických kyselin na potraviny

Dobře známou vlastností piva je stimulace sekrece žaludeční šťávy nízkou koncentrací alkoholu. Jak bylo zjištěno, ethanol není jediným aktivátorem této sekrece, podílejí se na ní také značným příspěvkem kyseliny jantarová a maleinová [3].

Studované organické kyseliny, jmenovitě citronová, octová, mléčná, jablečná, šťavelová a jantarová, hrají důležitou organoleptickou roli, čili způsobují chuť a vůni, a tone jenom piva, ale i všech potravin, ve kterých se vyskytují. Například, kyselá a ostrá chuť jablečného moštu je připisována kyselině mléčné a pocit celkové kyselosti kyselině octové [1, 6, 7]. Uvádí se, že specifické pro pivo jsou kyseliny pyrohroznová, jablečná, mléčná a citronová [8].

Dalo by se předpokládat, že kyseliny způsobují pouze kyselou chuť, ale tomu tak není vždy. Citronová kyselina může způsobit kyselo-sladkou chuť, jantarová slaně-hořkou. Při porovnání kyselé chuti kyseliny octové a minerální kyseliny bylo zjištěno, že v roztocích o stejném pH octová má kyselejší chuť, ale v ekvimolárních roztocích kyselejší chuť má minerální kyselina. Pražské hodnoty koncentrace kyselin mravenčí, jablečné a jantarové vzrůstají s rostoucím pH, ale pražské koncentrace kyseliny octové a mléčné vykazují opačné vlastnosti [1].

Přidáním organických kyselin k potravě můžeme zabránit sedimentaci a tmavnutí. Například kyseliny citronová a jablečná se používají pro zmenšení nebo zpoždění enzymatického zhnědnutí. Polykarboxylové kyseliny jako citronová a jablečná zabraňují oxidaci polyfenolů chelatací kovových kationtů, což je velmi důležité při výrobě piva z toho důvodu, že provaření piva probíhá v mladinových pánvích vyráběných z mědi. Naopak kyselina šťavelová je nežádoucí látkou, protože její nerozpustné vápenaté soli způsobují zákal piva a rychlé uvolňování CO₂ [1, 8].

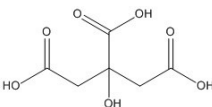
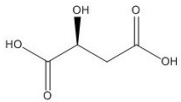
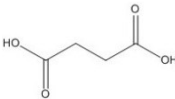
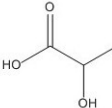

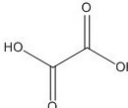
Kyselina jablečná může být převedena na kyselinu mléčnou fermentací, což snižuje celkovou kyselost nápoje. Poklesem kyselé chuti lze posílit vjem originální chuti a vůně a zvýšit biologickou stabilitu nápoje. Několik organických kyselin včetně jablečné a oxaloc-tové hrají roli v metabolismu cukru v ovocích [1].

Většina organických kyselin, majících jeden až čtrnáct uhlíkových atomů, vykazují bakteriostatické vlastnosti. V souladu s evropskými zákony, organické kyseliny mohou být používány jako přísady do potravin a nápojů a jsou zařazeny do kategorií regulátorů kyselosti, stabilizátorů nebo konzervantů. Množství těchto látek přidávaných do potravin se pohybuje v rozsáhlém intervalu (od 200 do 30 000 ppm). Kyseliny mléčná, citronová, fosforečná, adipová, fumarová, jablečná a jantarová jsou obvykle používány jako přísadky zvýrazňující kyselou chuť [1].

3.4. Fyzikálně-chemické vlastnosti organických kyselin

Při pokojové teplotě kyseliny citronová, jablečná, jantarová a šťavelová existují ve formě bílé krystalické látky, kyseliny mléčná a octová ve formě kapalné. Tyto kyseliny jsou velmi dobře rozpustné ve vodě a v ethanolu. Další fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tab. 2.: Přehled fyzikálně-chemických vlastností studovaných kyselin.

Kyselina	M [g/mol]	T_t	T_v	T_s	pK_{A1}	pK_{A2}	pK_{A3}	Strukturní vzorec	Sumární vzorec
Citronová	210	153	–	–	3,15	4,77	6,40		$C_6H_8O_7$
Jablečná	134	130	–	–	3,46	5,12	–		$C_4H_6O_5$
Jantarová	118	185	235	–	4,2	5,6	–		$C_4H_6O_4$
Mléčná	90	53	122	–	3,86	–	–		$C_3H_6O_4$
Octová	60	17	118	–	4,76	–	–		$C_2H_4O_2$
Šťavelová	90	–	–	157	1,27	2,85	–		$C_2H_2O_4$

T_t je teplota tání, T_v je teplota varu, T_s je teplota sublimace, pK_A je disociační konstanta.

3.5. Analýza organických kyselin

Úkolem této práce bylo vyvinout metodu stanovení kyselin šťavelové, jablečné, octové, mléčné, jantarové a citronové v pivu.

Pivo je komplikovaná matrice, obsahující mnoho různých látek, například, polyfenoly včetně flavonoidů, sacharidy, bílkoviny, karbonylové látky, vyšší alkoholy a estery, hořké kyseliny, které jsou představené směsí humulonů a lupulonů, vitamíny, anorganické ionty (např. kationty hořečnatý a vápenatý) a organické kyseliny. Tyto kyseliny jsou ve srovnání se sacharidy minoritní složkou, a proto je zapotřebí zvolit vhodnou přípravu vzorku, neboť tyto látky při analýzách vzájemně interferují. V současnosti existuje řada metod stanovení organických kyselin, ale jejich rozvoj se stále vyvíjí s ohledem na různé matrice a hlavně s vývojem stále nových účinnějších sorbentů pro přípravu vzorků a stále efektivnějších chromatografických kolon.

V literatuře a aplikačních listech distribučních firem s chemickým materiálem lze nalézt aplikace stanovení organických kyselin především v džusech a ve víně. Tyto metody lze jednoduše aplikovat také na jiné nápoje a tedy i na pivo. Jsou to metody elektrochemické, spektrofotometrické, enzymatické a chromatografické, zejména papírová chromatografie (PC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC), plynová chromatografie (GC), iontová chromatografie (IC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) především s UV a RI detekcí. Nevýhody některých těchto metod jsou příliš dlouhý čas analýzy nebo nedostatečná citlivost.

3.5.1. Historické metody

Nejstarší dostupné informace stanovení organických kyselin se datují od roku 1927. Ze směsi byly destilovány různé frakce a na základě teploty, při které se destilace prováděla, byl analyt identifikován [9].

3.5.2. Elektrochemické metody

Mezi elektrochemické metody patří kapilární elektroforéza (CE), která je jednou z nejvíce rozšířených metod v klinické biochemii i analytické chemii, ale není rutinní metodou jako HPLC. Výhodou této metody je možnost separace malých molekul v komplexní matici bez předčištění vzorků, což je umožněné v důsledku větší pohyblivosti malých molekul [2]. Je to alternativní metoda k HPLC vykazující vyšší efektivitu v kratším časovém úseku, který činí přibližně 10 minut v závislosti na uspořádání, pufru a dalších chemikáliích [5, 10, 11]. Další velkou výhodou CE je nízká spotřeba nosných roztoků (elektrolytů). Jak již bylo řečeno, většina CE metod vyžaduje pouze jednoduchou úpravu vzorku před vlastním měřením, jako je ředění, filtrace nebo centrifugace. V případě, že je k detekci použit UV detektor, neposkytuje tato metoda zcela přesné výsledky, neboť objem analyzovaného vzorku v cele je pouze několik nanolitrů [2]. Konduktometrická detekce (CD) je vhodná pro všechny kyseliny a není závislá na přítomnosti chromatorů [12, 13]. Konfigurace CE-MS je účinná a dostatečně citlivá, a srovnatelná s GC-MS. Uspořádání CE-MS se používá především ve farmaceutické analýze a bioanalýze, pro stanovení organických kyselin není však moc rozšířená [12].

Existují metody stanovení organických kyselin včetně mléčné, jablečné a citronové ve vině spolu s anorganickými anionty pomocí isotachoforézy [14].

Voltametrie je nedostatečně specifická, což klade vysoké nároky na dlouhodobé úpravy vzorku před analýzou [1].

3.5.3. Spektrofotometrické metody

Spektrofotometrické metody jsou obecně nedostatečně specifické a vyžadují delší úpravy vzorků před analýzou, jako extrakce kapalina-kapalina (LL) nebo extrakce na pevné fázi (SPE), při které se většinou používá silný aniontový iontoměnič. Tento krok je určen pro oddělení přírodních barviv nápoje, které ruší spektrofotometrické stanovení látek. Pak následuje komplexotvorná reakce s barevným produktem, který se stanoví při určité vlnové délce. Využívá se spektrofotometrické UV detekce.[1, 7]

3.5.4. Enzymatické metody

Jako většinu biologického materiálu lze stanovit organické kyseliny enzymaticky pomocí specifických enzymů podporujících katalytickou degradaci kyselin. Vyhodnocení se provádí spektrofotometrickým stanovením koncentrace NADH nebo NADPH při 340 nm. Tyto metody jsou velice specifické, což umožňuje zkrátit úpravy vzorků v komplikované matrici, jakými jsou potraviny a nápoje. Bohužel enzymatické metody vyžadují speciální sady pro každou kyselinu zvlášť, což mnohonásobně zvyšuje cenu analýzy vůči postupu pro stanovení všech kyselin najednou [1].

Enzymatické metody se používají hlavně pro stanovení kyselin jablečné, mléčné a citronové a pro rozdělení L- a D-izomerů příslušných kyselin. [5, 15, 16]

Občas jsou enzymatické metody používány jako referenční k metodám chromatografickým.

3.5.5. Chromatografické metody

Velký význam mají chromatografické metody, které se od ostatních metod odlišují zejména rychlostí analýzy a rozmanitostí látek, které jsou schopné rozdělit za stejných chromatografických podmínek. V literatuře existují aplikace s využitím TLC a PC, tyto metody však nejsou dostatečně citlivé a většinou ani selektivní. Proto se nejvíce používá metoda HPLC. Plynové chromatografie (GC) je málo používána pro stanovení organických kyselin z toho důvodu, že v případě organických kyselin se jedná zejména o netěkavé látky, které potřeba před GC analýzou derivatizovat.

3.5.5.1. Plynová chromatografie (GC)

Plynová chromatografie je velmi citlivá a vysoce selektivní metoda pro stanovení širokého spektra látek. Hlavní podmínkou je těkavost stanovovaných sloučenin nebo jejich derivátů. Bez předchozí derivatizace lze přímo stanovit metodou GC kyselinu octovou a mléčnou [17]. Derivatizace v GC je běžnou součástí přípravy vzorků.

Při derivatizaci měníme karboxylovou skupinu na methylovou nebo trimethylsilyl-etherovou skupinu, což je komplikovaný a dlouhý proces [18]. Někdy mohou být produkty derivatizace příliš těkavé, což snižuje výtěžnost, opakovatelnost a reprodukovatelnost [17]. Z tohoto důvodu nejsou GC metody zařazené do metod primárních.

Dnešní moderní techniky a vyvíjející se sorbenty umožňují separaci málo těkavých organických látek i bez derivatizace. Po přečištění vzorků metodou pomocí SPE na sorbentu C-18 a eluci methanolem je lze separovat na GC koloně, pokryté polární stacionární fází, jako glykolovaný polyethylen [19].

Většina metod nevyžaduje jen derivatizaci, ale také přečištění vzorků, které se provádí buď L-L extrakcí, SPE nebo precipitací solemi olova [17, 18].

Detekce se provádí většinou pomocí FID nebo MS [17 – 20].

3.5.5.2. Iontová Chromatografie (IC)

Pro separaci a kvantifikaci organických kyselin ve vzorcích potravin a nápojů je také používána metoda iontové chromatografie s konduktometrickou detekcí (CD). Tato technika je specifická pro organické kyseliny v potravinách a nápojích, protože CD minimalizuje interferenci s přítomnými cukry. Při použití metody IC není nutná komplikovaná příprava analyzovaných vzorků, jako jsou extrakce nebo derivatizace, ale detekce vyžaduje potlačení vodivosti prostředí, které se provádí různými technikami [1, 18, 21, 21]. Příklad IC separace s MS detekcí uvádí literatura [23], kdy na koloně s aniontovou výměnou selektivní na hydroxidový anion bylo rozděleno v jedné analýze třicet dva organických kyselin.

3.5.5.3. HPLC

Techniky HPLC se vyvíjejí rychlým tempem společně s vývojem nových a účinnějších sorbentů používaných jako stacionární fáze do chromatografických kolon. Současným trendem je zvyšování průchodnosti vzorku, neboli zkracování doby analýzy, zlepšování separačních vlastností a zvyšování citlivosti stanovení. Metoda HPLC umožňuje rychlé a citlivé stanovení organických kyselin v potravinách a nápojích, nevyžaduje přitom složité úpravy vzorků před analýzou.

Existuje velké množství metod HPLC založené na různém mechanismu separace, například, iontově výměnná, iontově vylučovací, iontově párová, rozdělení na normální fázi (NF) a na obrácené fázi (RF), vylučovací a další. V současné době jsou jen málokdy HPLC kolony naplněny sorbentem uskutečňujícím dělení pouze podle jednoho separačního mechanismu. Většina kolon dělí analyty na základě minimálně dvou mechanismů, což umožňuje zvýšení separačních schopností takové kolony. Hlavními principy využívanými pro rozdělení organických kyselin jsou kombinace vylučovacího mechanismu (rozdělení na základě různých velikostí) aniontové výměny (výměna iontů mezi MF a SF). K separaci těchto látek lze použít také kolony reverzní [23 – 28]. Iontová vylučovací chromatografie a reverzní chromatografie poskytuje při separaci organických kyselin dobré, rychlé a spolehlivé výsledky, a proto jsou hojně využívány [1, 21, 26, 29].

Při HPLC analýzách organických kyselin se nejčastěji používají detekce RI a UV-VIS, méně pak CD [22]. Nevýhodou RI detekce je její citlivost ke změnám okolních podmínek, jako jsou teplota, tlak a složení mobilní fáze (použití gradientové eluce není možné). Výhodou RI je současná detekce sacharidů a alkoholů. V některých případech však mohou tyto látky se stanovovanými kyselinami interferovat. UV-VIS detekce je nejvíce rozšířena pro stanovení studovaných analytů a nejpoužívanější vlnová délka pro sledování nederivatizovaných organických kyselin je 210 nm [1, 21, 23 – 25, 29 – 31].

Při pH 3-6 jsou organické kyseliny ionizované a nevykazují jinou absorpční, než absorpce karboxylové skupiny, která slabě absorbuje elektromagnetické záření při vlnové délce kolem 200 nm [2].

Na současném trhu existuje řada HPLC kolon od různých výrobců s různými mechanismy dělení. Iontoměničové kolony, které jsou schopné dělit slabé organické kyseliny, jsou vyráběny na základě polymerů se zakotvenou skupinou nesoucí kladný náboj H^+ , který při separaci interaguje s kyselými anionty a způsobuje rozdělení analytů. Kromě iontově-výměnného mechanismu může sorbent dělit analyty také na základě jejich velikosti na molekulovém síti a to tak, že nejmenší molekuly jsou zadržovány v sorbentu delší čas než větší molekuly.

V tabulce 3 je uveden aktuální přehled dostupných chromatografických kolon doporučených pro separaci organických kyselin. Všechny tyto kolony obsahují stejný sorbent (sulfonovaný kopolymer na základě styrendivinylbenzenové pryskyřice).

Tab. 3.: Přehled vybraných kolon používaných pro analýzu organických kyselin.

Komerční název	EK H	RHM	ROA	SG C-610H	SG H	Aminex
Náplň	Sulfonovaný kopolymer na základě styrendivinylnbenzenové pryskyřice obsahující navázané H ⁺ ionty					
Velikost částic [μm]	10	8	8	9	9	9
max p [MPa]	10	4	4	6,9	6,9	10,3
max t [°C]	90	85	85	60	90	65
max u [ml/min]	1,2	0,6	0,6	1,5	1,5	1,0
pH	stab.	neutrální	1-3	1-13	1-13	1-3
t analýzy [min]	25	20	25-40	–	–	–
MF	0,01N sí- rová kys.	0,005N sí- rová kys.; 0,1% mravenčí kys.	voda; 0,5% trifluorooctová kys.	0,1% trihydrogenfosfo- rečná nebo sírová kys.		0,05N sí- rová kys. + 6% aceto- nitril
kyseliny						
citronová	v	v	v	v	v	v
jablečná	–	–	v	v	v	v
jantarová	v	v	v	v	v	v
mléčná	v	v	–	–	–	v
octová	v	v	v	v	v	v
šťavelová	–	v	v	v	v	–
další lát- ky	cukry, alkoholy	cukry	alkoholy	cukry, alko- holy	–	cukry, ethanol
literatura	4, 32, 33	–	29, 34	35	–	1, 21, 25, 30

– nebylo uvedeno, v – jsou stanovovány, stab. - je stabilní v celé pH oblasti. Podmínky analýzy jsou v experimentální části. Označení kolon: EK H - Eurokat H (Knauer), RHM – Rezex Monosaccharide (Phenomenex), ROA – Rezex Organic Acid (Phenomenex), SG C-610H - Supelcogel C-610H (Supelco), SG H - Supelcogel H (Supelco), Aminex- Aminex HPX-87H (Bio-Rad).

Porovnáním literárních dostupných zdrojů bylo zjištěno, že nejvíce rozšířenou kolonou pro separaci organických kyselin v různých nápojích metodou HPLC je kolona Aminex HPX-87H od společnosti Bio-Rad. Výrobce doporučuje používat kyselinu sírovou jako MF a UV detekci při vlnové délce kolem 200 nm. Z této rešerše vyplývá, že je tato kolona používána nejen k separaci organických kyselin, ale také cukrů a alkoholů. Jako mobilní fáze se používá buď zředěná kyselina sírová, nebo její směs s acetonitrilem [22, 25, 30].

Kolona Supelcogel C-610H byla použita pro stanovení kyselin, jako produktů fermentace hub. Jako mobilní fáze byl použit ředěný roztok kyseliny fosforečné, k detekci byl použit UV detektor [35]. Kolona Rezex ROA se používá pro stanovení organických kyselin s UV detekcí [29] a pro sledování fermentace ethanolu z cukrů s RI detekcí [34]. Jako MF se v obou případech používá vodný roztok kyseliny sírové.

Kolona Eurokat H byla zvolena v důsledku toho, že základem používané metody byl předepsaný návod od MEBAK [4]. Tato kolona se používala také pro stanovení monosacharidů a jejich derivátů [33].

3.6. Úpravy vzorku před analýzou

Jak už bylo zmíněno výše, existuje několik různých postupů pro úpravu vzorku před analýzou (přečištění, prekoncentrace, derivatizace). V této práci byla použita extrakce na pevné fázi (SPE).

Tento krok je nutný z toho důvodu, že pivo obsahuje velké množství interferujících látek. Například, při stanovení organických kyselin s RI detekcí mají největší rušivý vliv mono- a disacharidy, při stanovení kyselin s UV detekcí nejvíce interferují barevné látky, které absorbují při zvolené vlnové délce 210 nm.

Pro absorpci slabých aniontů a jejich odstranění z matrice se klasicky používá silný anex, který je náplní například kolonky Bond Elute SAX 500 mg, Agilent. Jako nosič je zde použit silikagel, funkční skupinu tvoří trimethylaminpropyl. Iontoměničové schopnosti sorbentu jsou závislé především na pH roztoku a iontové síle aplikovaných iontů, v menší míře na iontové síle roztoku, ve kterém ionty jsou. Primárním mechanismem retence jsou elektrostatické čili iontové interakce.

Při vývoji metody musí být vzata do úvahy kapacita kolonky. Kdyby došlo k jejímu překročení, separace by nebyla účinná. Kapacita kolonky odpovídá 5% hmotnosti sorbentu a činí 25 mg. Průměrné celkové množství studovaných organických kyselin činí 1 g/l, což znamená, že kapacita kolonky bude stačit k aplikaci 125 ml pětkrát naředěného vzorku nebo 250 ml desetkrát naředěného vzorku. Díky svému složení sorbent použitý v kolonce SAX poskytuje minimální nepolární interakce [18, 25, 29, 31].

Při použití anexu je nutné, aby látky, které chceme zadržet na sorbentu, byly v disociované formě, proto upravujeme pH vzorků na 9. Při této hodnotě pH jsou slabé organické kyseliny disociovány z více než 99 % a jsou kvantitativně zadržovány na sorbentu. Za takových podmínek jsou cukry vymývány vodou, kyseliny jsou poté eluovány vodným roztokem kyseliny sírové. [25, 29]

Dalším možným a stále využívaným způsobem předčištění vzorků je extrakce na nepolární fázi. V tomto případě se jako sorbent používá C-18 nebo aktivní uhlí [19, 29]. Cílem tohoto postupu je využít nepolárních interakcí pro zadržení cukrů a interferujících složek na koloně, naopak stanovené polární ionty kolonou projdou bez sebemenší zádrže.

Omezením je opět kapacita kolonky. Musíme uvažovat, že průměrné množství sacharidů v pivu je 4 g/100ml a kapacita kolonky činí 5 % hmotnosti sorbentu, což odpovídá 25 mg při hmotnosti náplně 500 mg. To znamená, že můžeme aplikovat 3 ml pětkrát ředěného vzorku nebo 6 ml desetkrát ředěného vzorku, a všechny přítomné cukry by měly být zachycené na kolonce.

Vyzkoušený nepolární sorbent byl náplní kolonky Supelkugel ENVI Carb 500 mg, Supelco (CB). Cílem bylo ověřit, za jakých podmínek cukry a interferující barviva jsou zadrženy v dostatečné míře na sorbentu a disociované organické kyseliny projdou nezměněné kolonkou.

4. Experimentální část

4.1. Použité chemikálie

monohydrát kyseliny citronové	MBG, Merck, Darmstadt, Německo
kyselina L/D – jablečná	pro BCh, Merck, Darmstadt, Německo
kyselina jantarová	Merck, Darmstadt, Německo
kyselina L/D – mléčná, 90%	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
kyselina octová, 99,5%	Dr. Ehrenstorfer, GmbH, Augsburg, Německo
dihydrát kyseliny šťavelové	Merck, Darmstadt, Německo
ultračistá voda	Milli-Qwater, Madrid, Španělsko
kyselina sírová	Merck, Darmstadt, Německo
kyselina chlorovodíková	Merck, Darmstadt, Německo
hydroxid sodný	Lachner, Česká republika
ethanol	Lachner, Česká republika
methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Německo
glukosa	pro BCh, Merck, Darmstadt, Německo
maltosa	pro BCh, Merck, Darmstadt, Německo
fruktosa	pro BCh, Merck, Darmstadt, Německo

4.2. Použitá aparatura

Pro HPLC stanovení bylo použito izokratické čerpadlo HPI-100 (SISw, Česká Republika). Dávkování vzorku na kolonu Eurokat H, 10 μm , 300 x 4 mm, (KNAUER, Berlin, Německo) s předkolonkou (Eurokat H, 10 μm) bylo provedeno pomocí automatického dávkovače MIDAS (SPARK, Nizozemsko) s dávkovací smyčkou o objemu 10 μl . K zahřívání kolony na požadovanou teplotu byl použit kolonový termostat SICO-100 (SISw, Česká Republika). Jako mobilní fáze (MF) byla použita 0,01 N kyselina sírová. Před vstupem do systému MF byla odplyněna na degaseru (SISw, Česká Republika).

K UV detekci byl použit SAPPHIRE UV-VIS detektor pro HPLC (ECOM, Česká Republika), měření se provádělo při vlnové délce 210 nm. K RI detekci byl použit RI detektor Shodex RI-101 (SHOWA DENKO, Japonsko).

Vyhodnocení dat bylo provedeno pomocí chromatografického software Clarity (DataApex, Česká Republika).

4.3. Další použitá zařízení

analytické váhy	Sartorius
pH metr	OP – 211/1
magnetická míchačka	MR Hei-Mix S, Heidolph
ultrazvuková lázeň	Tesla, Československo

Vzorky byly před HPLC analýzou přečištěny pomocí SPE kolonky Bond Elut SAX (Agilent Technologies, USA) a SPE kolonky ENVI-Carb (SUPELCO, Sigma-Aldrich, Německo)

4.4. Příprava roztoků a vzorku

4.4.1. Standardní roztoky

4.4.1.1. Organické kyseliny

Zásobní standardní roztok organických kyselin byl připraven smícháním šesti uvedených kyselin, které byly rozpuštěny v 4%ethanolu (v/v), aby matrice standardu odpovídala matrici piva. Koncentrace kyselin v zásobním roztoku odpovídá očekávané koncentraci kyselin v pivu [36]:

kyselina citronová	0,10 g/l
kyselina jablečná	0,15 g/l
kyselina jantarová	0,20 g/l
kyselina mléčná	0,20 g/l
kyselina octová	0,10 g/l
kyselina šťavelová	0,03 g/l

Kyseliny byly rozpuštěny v ultračisté vodě s přidavkem 4 ml ethanolu ve 100ml odměrné baňce. Standardy použité ke kalibraci byly připraveny ze zásobního roztoku způsobem, uvedeným v tabulce 4. Ředění roztoku bylo provedeno 4% (v/v) ethanolem.

Tab. 4.: Příprava standardních roztoků

Připravovaný roztok	Použitý roztok	Faktor ředění	Výsledná koncentrace citronové kyseliny (g/l) (ideální případ)
Zásobní roztok (ZR)			1,000
Standard 3 (St 3)	ZR	10	0,100
Standard 2 (St 2)	St 3	5	0,020
Standard 1 (St 1)	St 3	10	0,010
Standard 0 (St 0)	St 1	2	0,005

Původní koncentrace kyselin v zásobním roztoku ZR byla desetkrát větší, než očekávané koncentrace v pivu, koncentrace ve standardu St 3 odpovídala očekávaným koncentracím [36].

4.4.1.2. Sacharidy

Jako standard cukru, pro určení retenčních času maltosy, glukosy, fruktosy a glycerolu, byl použit standard připravený pro analýzu cukru v pivu o přibližné koncentraci každé látky 0,5 g/l.

4.4.1.3. Směsný standard s glukosou

Jako směsný standard byla použita směs šesti organických kyselin a glukosy. Roztok byl připraven následujícím způsobem: do 100ml odměrné baňky byly navážené organické kyseliny (navážky viz. výše), 0,4 g glukosy a 4 ml ethanolu. Pak baňka byla doplněna po rysku ultračistou vodou. Z tohoto zásobního roztoku byl připraven jeden standard ředěním 20 krát.

4.4.2. Příprava roztoku pro standardní přídavek

Jako standardní přídavek byl použit koncentrovaný roztok směsi šesti kyselin rozpouštěných v 10 ml deionizované vody:

kyselina citronová	0,15 g/10 ml
kyselina jablečná	0,30 g/10 ml
kyselina jantarová	0,10 g/10 ml
kyselina mléčná	0,20 g/10 ml
kyselina octová	0,10 g/10 ml
kyselina šťavelová	0,10 g/10 ml

Přídavek 1 ml nebo 4 ml roztoku byl doplněn do 100 ml neředěným vzorkem.

4.4.3. Příprava reálných vzorků

Organické kyseliny byly výslednou metodou stanoveny v pěti reálných vzorcích těchto piv:

Gambrinus 10° Original (alk. 4,3% obj.)

Carlsberg (alk. 5,0% obj.)

Birell (alk. 0,49% obj.)

Potřebné množství piva (100-150 ml) se nejprve odpění. Vzorek se vloží na 1 min do ultrazvukové lázně a poté se nechá odstát, dokud pěna zcela nevymizí. Poté jsou vzorky pětikrát naředěny ultračistou vodou.

Před SPE extrakcí se upraví pH vzorků roztokem hydroxidu sodného na hodnotu 9.

4.5. Pracovní postup

4.5.1. SPE – extrakce na pevné fázi

Extrakce na pevné fázi byla provedena několika různými způsoby s použitím dvou kolonek od různých výrobců.

Postup pro kolonku Bond Elut SAX (SAX)

Kondicionace 2 ml methanolu

Promytí 2 ml ultračistévody

Aplikace 3 ml vzorku

Promytí vodou

Vysušení vzduchem 5 min

Eluce 3 ml 0,1N kyseliny sírové

Postup pro kolonku ENVI-Carb (CB)

Kondicionace 2 ml methanolu

Promytí 2 ml ultračistévody

Aplikace 3 ml vzorku (jímanáfrakce)

4.5.2.HPLC analýza

Pro analýzu byla zvolena HPLC kolona Eurokat H, 10 μ m, 300 x 8 mm, KNAUER na bázi sulfonovaného kopolymeru [36].

Podmínky analýzy:

MF	0,01N kyselina sírová
Teplota kolony	75 °C
Průtok	0,2 ml/min

4.5.3. Detekce

K detekci separovaných látek byly použity detektory RI a UV, který byl nastaven na vlnovou délku 210 nm.

5. Výsledky a diskuze

5.1. Optimalizace chromatografických podmínek

Pro stanovení organických kyselin v pivu byly optimalizovány chromatografické podmínky metody, její základem byla metoda stanovení organických kyselin v mladině a pivu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií na polární koloně Eurokat H se separačním mechanismem iontové výměny [4].

Optimalizace se prováděla pro RI detekci. Při stanovení kyselin UV detekcí se používaly stejné chromatografické podmínky.

5.1.1. Výběr stacionární fáze

Pro analýzu byla zvolena kolona se stacionární fází na bázi polymerové pryskyřice Eurokat H (300x4 mm, 9 μ m) od firmy Knauer, která byla doporučována ve výše uvedené metodě.

5.1.2. Optimalizace mobilní fáze

Jako mobilní fáze byl použit vodný roztok kyseliny sírové. Byly testovány mobilní fáze o různých koncentracích: 0,1 N a 0,01 N, což se rovná 0,2 mol/l a 0,02 mol/l, které byly testovány při průtocích 0,2 a 0,5 ml/min.

Zjistilo se, že koncentrace kyseliny sírové ve sledovaném intervalu má zanedbatelný vliv na průběh separace. Naproti tomu se jako významný parametr ovlivňující průběh separace ukázal průtok mobilní fáze. Posun retenčních časů při změnách průtoku lze znázornit na příkladu ethanolu, který je nejvíce zadržován na koloně. Při průtoku 0,5 ml/min retenční čas (t_R) ethanolu je 7,7 min, což je dostatečně krátký čas analýzy, ale rozdělení píků za těchto podmínek nebylo účinné. Při průtoku MF 0,2 ml/min $t_R(\text{EtOH}) = 18,9$ min. Za takových podmínek rozdělení stanovovaných kyselin a účinnost separace byly nejlepší.

5.1.3. Optimalizace teploty separační kolony

Pro vybranou kolonu byly získané retenční časy závislé na použité teplotě kolony. Tato závislost byla proměřena při teplotách 45°C a 75°C.

Ukázalo se, že teplota má vliv na rozdělení píku. Při větší teplotě bylo rozdělení lepší, proto byla zvolena vyšší teplota.

5.1.4. Výběr vlnové délky pro detekci

Pro UV detekci byla vybrána vlnová délka 210 nm na základě předchozích studií (viz. teoretická část).

5.2. Chromatografické podmínky

Na základě testu vhodnosti chromatografického systému byly pro stanovení organických kyselin vybrány následující podmínky: polymerní kolona Eurokat H (300 x 4 mm, 9 µm, Knauer), eluce 10 µl dávkovaného vzorku se prováděla mobilní fází o koncentraci kyseliny sírové 0,01 N s rychlosti průtoku 0,2 ml/min. Stanovení množství analytů se provádělo metodou kalibrační křivky.

Detekce se prováděla vysoko citlivým RI detektorem a UV-VIS detektorem, nastaveným na vlnovou délku 210 nm.

5.3. Test vhodnosti chromatografického systému

Test definuje minimální požadavky na kritéria, které metoda musí splnit, aby byla přijata do praxe. Primární parametry testu jsou počet teoretických pater, faktor symetrie píku a rozlišení píku. Hodnoty primárních parametrů se počítají dle definovaných testů a porovnávají s minimálními hodnotami kritérií. Splnění minimálních hodnot zajišťuje vhodnost zvolených podmínek (tab. 5).

Všechna kritéria byly vypočtena podle vzorců uvedených v příloze 1. Vhodnost chromatografického systému byla testována při analýze za výše uvedených podmínek na standardním roztoku St 3 o koncentraci organických kyselin 0,03-0,20 g/l (viz. 4.4.1.1.).

Kritická hodnota počtu teoretických pater pro každý analyt je 1500. Kritická hodnota pro faktor symetrie píku musí ležet mezi hodnotami 0,8 až 1,5. Aby systém splňoval podmínky vhodnosti rozlišení píku, musí být větší nebo rovnat se 1,5.

Tab. 5.: Test vhodnosti chromatografického systému pro studované kyseliny. Srovnání dvou detekčních systémů.

Kyselina	RI detektor			UV detektor		
	N_s	A	$R_{1,2}$	N_s	A	$R_{1,2}$
Šťavelová	2374	1,644		860	1,340	
Citronová	1631	1,243	1,783	1249	1,327	1,510
Jablečná	2044	1,189	1,528	1791	1,060	1,414
Jantarová	2100	1,141	1,646	1742	1,000	1,551
Mléčná	1970	1,089	1,201	1635	0,967	1,106
Octová	3044	1,029	1,680	2768	0,986	1,603

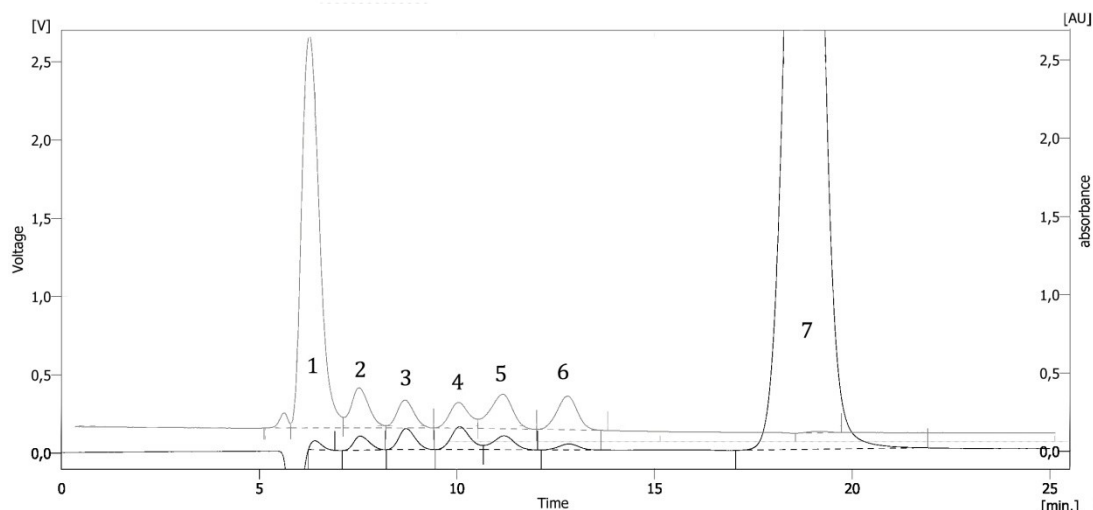
N_s je počet teoretických pater, A je faktor symetrie píku, $R_{1,2}$ je rozlišení píku. Tučně jsou zvýrazněny hodnoty neodpovídající požadovaným hodnotám kritéria.

Jak je vidět z tabulky 5 požadována kritéria jsou splněna pro většinu analytů.

Počet teoretických pater vyhovuje požadovaným kritériím v případě detekce RI detektorem. V případě detekce UV detektorem počet teoretických pater pro píky kyselin šťavelové a citronové nedosahují kritické hodnoty, ale hodnoty symetrie a rozlišení píku vyhovují požadavkům. Z obrázku 1 je zřejmé, že píky kyselin šťavelové a citronové jsou dobře vyhodnotitelné. Z obrázku 1 je také vidět, jak výrazně se změnila odezva kyseliny šťavelové, a její mnohonásobné zvětšení ovlivnilo počet teoretických pater.

Hodnoty symetrie píku splňují daná kritéria, což znamená, že chromatografické podmínky jsou pro tuto analýzu vhodné. Z obrázku 1 je patrné, že patrné RI systém detekuje nástríkový pík (kyselina sírová poskytuje odezvu na RI detektoru), který významně ovlivňuje tvar píku kyseliny šťavelové a tím i jeho vyhodnocení.

Při testování chromatografických podmínek pro kolonu Eurokat H bylo zjištěno, že za daných podmínek bylo dosaženo vhodného rozlišení mezi píky kyselin jantarové a mléčné. Na obr. 1 je vidět, že píky kyselin jsou dostatečně rozděleny, aby jejich vyhodnocení bylo snadné a bezchybné. Rozdělení ostatních píků bylo také provedeno na základní linii a odpovídá tedy předem stanoveným požadavkům.

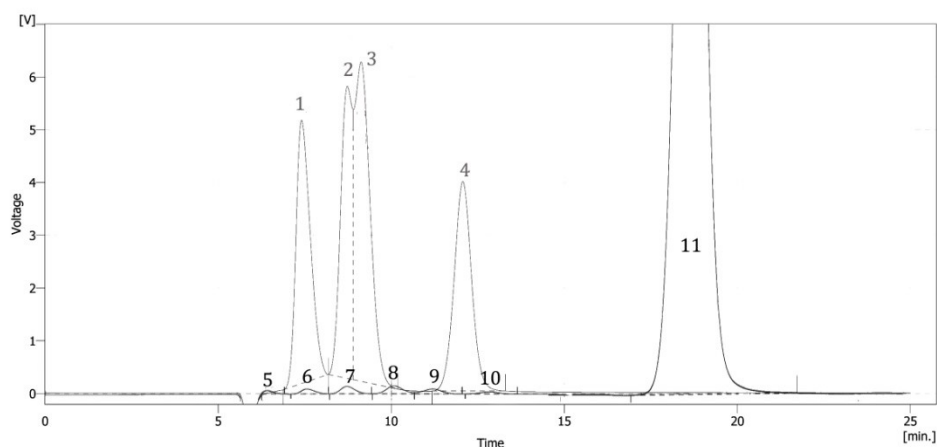


Obr. 1. Porovnání odezvy St 3 získané z RI detektoru (černá čára) a UV detektoru (šedá čára). Píky: (1) šťavelová, (2) citronová, (3) jablečná, (4) jantarová, (5) mléčná, (6) octová, (7) ethanol.

5.4. Optimalizace extrakčních podmínek

Přímý nástřik desetkrát ředěného piva ukázal, že v důsledku velkého množství přítomných interferentů stanovení organických kyselin bez úpravy vzorku před analýzou není možné. Odstranění interferující matrice lze udělat pomocí SPE.

Na obrázku 2 je vidět, jak velké množství cukrů obsahuje matrice a jako velkou interferenci cukry způsobují při použití RI detekce.



Orb. 2. Porovnání chromatogramů standardu cukrů (šedá čára) o koncentraci 0,5 g/100 ml a standardu organických kyselin (černá čára) o koncentraci odpovídající St 3 získané při RI detekci. Píky: (1) maltóza, (2) glukóza, (3) fruktóza, (4) glycerol, (5) kys. šťavelová, (6) kys. citronová, (7) kys. jablečná, (8) kys. jantarová, (9) kys. mléčná, (10) kys. octová, (11) ethanol.

5.4.1. Extrakce na anexu (SAX)

Kondicionace se prováděla dle doporučení od výrobce 2 ml methanolu. Promytí kolonky před aplikací vzorku bylo provedeno dvěma způsoby: 2 ml deionizované vody nebo 2 ml 1M kyseliny chlorovodíkové. Bylo zjištěno, že způsob promytí kolonky po kondicionaci nemá vliv na výtěžnost.

Pak následovala aplikace vzorku na mokrou kolonku. Vzorek se aplikoval ve dvou provedení: 3 ml ředěného vzorku bez úpravy pH a s úpravou pH na 9 hydroxidem sodným. Bylo zjištěno, že úprava pH způsobuje lepší zadržování aniontů kyselin v důsledku jejich úplné disociace (disociační konstanty studovaných kyselin jsou uvedeny v tab. 2).

Pak následoval krok promytí kolonky neionizovanou vodou. Při aplikaci vzorku bez úpravy pH a následném promytí vodou bylo zjištěno, že kyseliny octová a šťavelová nejsou dostatečně zadržované na sorbentu a iontová síla vody je dostatečná pro jejich eluci, která v tomto kroku je nežádoucí. V tom případě, kdy krok promytí po aplikaci byl vynechán, zjistilo se, že na sorbentu zbývá dostatečně velké množství interferujících látek, které ruší RI detekci. Při aplikaci vzorku s upraveným pH promytí sorbentu vodou nesnižovalo výtěžnost.

Eluce se prováděla 0,1N kyselinou sírovou. Byly vyzkoušené koncentrace elučního roztoku 0,02N, 0,1N a 0,5N a bylo zjištěno, že koncentrace elučního roztoku má významný vliv na výtěžnost kyselin. Při použití 0,02N roztoku výtěžnost byla mnohem nižší, než při použití roztoků o koncentraci 0,1N a 0,5N, které byly srovnatelné. V důsledku toho, že kyselina sírová poskytuje odezvu na RI detektoru, byl zvolen eluční roztok o koncentraci 0,1N kyseliny sírové, protože pík, poskytovaný větší koncentrací interferoval pík kyseliny šťavelové.

Ověření kapacity kolonky se provádělo aplikací 1 až 5 ml vzorku, koncentrace kyselin ve kterém odpovídala pětikrát zředěnému pivu. Eluce se prováděla 3 ml 0,1N kyseliny sírové dvakrát pro ověření toho, že 3 ml elučního roztoku jsou dostatečné pro kvantitativní eluci organických kyselin ze sorbentu. Na základě výsledků obdržených z tohoto pokusu objem aplikovaného vzorku byl zvolen 3 ml, protože rozdíl ve výtěžnosti při aplikaci 2 až 5ml vzorku činil 3 – 7 % pro všechny kyseliny a pohyboval v rozmezí 78 – 115%. Při eluci 3 ml přepočet koncentrace původního vzorku bude jednodušší, čímž můžeme zamezit vzniku náhodných chyb.

Eluce organických aniontů 3 ml 0,1N kyseliny sírové byla dostatečná pro kvantitativní vymytí látek ze sorbentu, což se potvrdilo ne jenom vysokými hodnotami výtěžnosti, no i tím, že kyseliny ve druhém eluátu nebyly nalezené.

Určování výtěžnosti se provádělo aplikaci standardů o známé koncentraci a aplikaci reálného vzorku se standardním přídatkem. Stanovení výtěžnosti metodou standardního přídatku k reálným vzorkům se provádělo na základě dvou hladin koncentrace: zvýšení původní koncentrace dvakrát (1 ml roztoku standardního přídatku + 99 ml vzorku) a pětkrát (4 ml roztoku standardního přídatku + 96 ml vzorku). Příprava analyzovaných roztoků se prováděla v odměrných baňkách, pH všech vzorků bylo upraveno na 9. V obou případech výtěžnost byla velmi podobná a pro kyseliny šťavelovou, citronovou, jablečnou, jantarovou a mléčnou a činila 86 – 104 % (relativní směrodatná odchylka RSD = 5 – 11 % (vzorci pro výpočet výtěžnosti a RSD jsou v příloze 1). Pro kyselinu octovou výtěžnost nebyla tak velká 64 %, ale relativní směrodatná odchylka měla dostatečně nízkou hodnotu 4 %.

Jelikož je pivo matrice, která v závislosti na druhu piva obsahuje různou koncentraci ethanolu, bylo dále nutné otestovat, zda má přítomný ethanol vliv na výtěžnost extrakční metody. Výtěžnost metody se stanovila za použití nealkoholického piva Birell metodou standardního přídatku na dvou koncentračních hladinách: zvýšení předpokládané koncentrace organických kyselin ve vzorku dvakrát (1 ml roztoku standardního přídatku + 99 ml vzorku) a pětkrát (4 ml roztoku standardního přídatku + 96 ml vzorku). Stanovení se provádělo dvojmo. Jednou byla pro pětinasobné ředění vzorků použita deionizovaná voda, ve druhém případě byl použit 4% (v/v) roztok ethanolu. Po ředění vzorků jejich pH bylo upraveno na 9 hydroxidem sodným.

Srovnáním koncentrací organických kyselin ve vzorku ředěném vodou a 4% roztokem ethanolu bylo zjištěno, že koncentrace ethanolu na této hladině (běžná pro klasická piva) nemá vliv na separační mechanismus analytů na anexovém sorbentu, a tedy neovlivňuje výtěžnost extrakčního postupu (tab. 6).

5.4.2. Extrakce na nepolárním sorbentu (ENVI-Carb (CB))

V důsledku toho, že extrakce na této kolonce je založená na jiném principu, postup provedení je taký odlišný.

Prvním krokem je kondicionace 2 ml methanolu dle doporučení od výrobce. Pak následovalo promytí 2 ml ultračisté vody. Promytí kolonky 1 M kyselinou chlorovodíkovou jako v případě s kolonkou SAX není nutné z toho důvodu, že sorbentem není iontoměnič a není zapotřebí ho aktivovat. Pak následovala aplikace vzorku, při níž se okamžitě jímá eluát.

Pokusy se prováděly aplikací standardů organických kyselin, směsného standardu a reálných vzorků. Standardy organických kyselin o koncentraci odpovídající St 3 a St 1 byly nanесeny ve dvou provedeních: s úpravou pH a bez úpravy pH. Ukázalo se, že větší výtěžnosti bylo dosaženo u vzorků s upraveným pH. Pro vzorky standardních roztoků bez úpravy pH výtěžnost činila 6 až 60 % a analýzou eluátu bylo zjištěno, že skoro 50 % množství kyselin zbývá na sorbentu (eluce se prováděla stejně jako u SAX – 0,1 N kyselinou sírovou). Dále se zkoušela eluce ve dvou krocích a ukázalo se, že 3 ml 0,1N kyseliny sírové nestačí na vymytí všech kyselin. Aplikací vzorků s upraveným pH bylo dosaženo lepší výtěžnosti kyselin a pokračovalo s testováním výtěžnosti směsného standardu s glukosou a reálných vzorků.

Bylo zjištěno, že kapacita kolonky je dostatečná pouze pro sorpci 25 mg sacharidů ze vzorku, což odpovídá 3 ml pětkrát ředěného reálného vzorku za předpokladu, že průměrná koncentrace celkových sacharidů v pivu se rovná 4 g/100 ml.

5.5. Porovnání výsledků SPE

Byly vyzkoušeny obě kolonky a zjistilo se, že lepší výtěžnost poskytuje předčištění vzorku na silném anexu (SAX) (tab. 6). Použití kolonky CB se neosvědčilo, protože při aplikaci vzorku kromě cukru bylo také zadržováno dostatečné množství organických kyselin. Následné promytí kolonky vodou nebylo možné v důsledku toho, že eluční síla vody byla dostatečná, aby spolu se zadrženými kyselinami.

Tab. 6.: Porovnání výtěžnosti studovaných kolonek pro SPE.

Kyselina	SAX	CB		
	V2 (%)	V5 (%)	V2 (%)	V5 (%)
Šťavelová	90	92	33	40
Citronová	102	105	12	28
Jablečná	75	82	27	39
Jantarová	63	85	25	33
Mléčná	119	109	39	46
Octová	62	65	18	34

Porovnání výtěžnosti bylo provedeno na reálných vzorcích piva Gambrinus se dvěma hladinami standardního přídatku: (V2) – zvýšení předpokládané koncentrace analytu dvakrát přidáním 1 ml spikovacího roztoku a 99 ml vzorku a (V5) – zvýšení předpokládané koncentrace analytu v analyzovaném roztoku pětkrát (4 ml roztoku a 96 ml vzorku).

5.6. Linearita, limity detekce a stanovitelnosti (LOD a LOQ)

Měřením za výše uvedených podmínek v určitých mezích koncentrace byla získána lineární závislost koncentrace organických kyselin na napětí (odezva RI detektoru) a na absorbanci při vlnové délce 210 nm. Koncentrační meze, ve kterých byla tato závislost lineární, jsou uvedeny v tabulce 7.

Tab. 7.: Lineární rozsah koncentrací organických kyselin.

Kyselina	dc _{RI} (g/l)	dc _{UV} (g/l)
Šťavelová	0,008 – 0,160	0,002 – 0,073
Citronová	0,010 – 0,200	0,002 – 0,100
Jablečná	0,015 – 0,320	0,002 – 0,100
Jantarová	0,020 – 0,400	0,003 – 0,130
Mléčná	0,020 – 0,400	0,005 – 0,210
Octová	0,010 – 0,200	0,005 – 0,210

Odlišné meze koncentrací uváděně pro různé detektory jsou dané odlišnými limity detekce a stanovitelnosti (LOD a LOQ) pro příslušné detektory (tab. 8 a 9). Vzorce, podle kterých se počítaly hodnoty LOD a LOQ, jsou uvedeny v příloze.

Pro testování linearity závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu bylo zvoleno pět koncentračních hladin analytů. Linearitu dvou proměnných lze vyjádřit korelačním koeficientem R , který určuje rozptyl bodů kolem regresní přímky (tab. 8 a 9). Čím více se blíží hodnota korelačního koeficientu jedné, tím lineárnější je závislost odezvy na koncentraci vyjádřená rovnicí regresní přímky

$$y = k \cdot x + q$$

kde y je odezva detektoru a x – příslušná koncentrace.

Tab. 8. Parametry regresní rovnice $y=kx+q$, korelační koeficient R a limity detekce a stanovitelnosti pro RI detektor.

Kyselina	k (mV·l·g ⁻¹)	q (mV)	R	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
Šťavelová	351,9	-3,5	0,9974	5,97	19,89
Citronová	496,4	1,0	0,9999	4,23	14,10
Jablečná	460,9	0,9	0,9997	4,56	15,19
Jantarová	375,3	3,3	0,9960	5,60	18,65
Mléčná	242,6	1,8	0,9961	8,66	28,85
Octová	569,9	0,9	0,9998	3,69	12,28

Tab. 9. Parametry regresní rovnice $y=kx+q$, korelační koeficient R a limity detekce a stanovitelnosti pro UV detektor.

Kyselina	k (mAU·l·g ⁻¹)	q (mAU)	R	LOD (mg/l)	LOQ (mg/l)
Šťavelová	21357,7	2,1	1,0000	0,01	0,02
Citronová	1735,2	3,3	0,9999	0,09	0,29
Jablečná	1061,5	0,7	1,0000	0,14	0,47
Jantarová	866,5	0,2	0,9999	0,17	0,58
Mléčná	848,8	0,4	0,9999	0,18	0,59
Octová	756,4	-0,1	1,0000	0,20	0,66

Detekce UV má v průměru čtyřicetkrát menší detekční limity než RI pro všechny kyseliny, kromě kyseliny šťavelové, která má šestsetkrát větší citlivost na UV detektoru oproti RI. Hodnoty LOD pro oba detekční systémy jsou menší, než koncentrace příslušných organických kyselin v desetkrát ředěném vzorku.

Z důvodu velkého rozdílu v limitech detekce kyselin se doporučuje používat UV detektor, ale možnost použití RI detekce je velmi důležitá z pohledu rutinních analýz. Detektor RI umožňuje současnou detekci organických kyselin a sacharidů při použití vhodných chromatografických podmínek, to však nebylo náplní této práce.

Z hodnot korelačních koeficientů získaných pro oba detekční systémy z kalibračních křivek vyplývá vynikající vhodnost obou systémů bez ohledu na detekční limity (tab. 8 a 9).

Pěti paralelními stanovení St 1 byla testována opakovatelnost vyvinuté metody. Opakovatelnost je test shody výsledků metody získaných v jedné laboratoři jedním pracovníkem použitím stejných přístrojů v krátkém časovém intervalu (jeden den). Míra shody výsledků je vyjadřována relativní směrodatnou odchylkou (RSD) retenčních časů a ploch píků.

Pro oba detekční systémy hodnoty RSD retenčních času nepřesahovaly 0,5 %, RSD ploch píků pro kyseliny citronovou, jantarovou, jablečnou, mléčnou a octovou byly menší 10 %. Hodnota RSD plochy píku kyseliny šťavelové při použití RI detektoru činila 12 %, což se dá vysvětlit obtížným vyhodnocením její píku, ale hodnota RSD plochy píku kyseliny šťavelové při použití UV detektoru činila 5%. Z obrázku 1 je dobře vidět rozdíl mezi odezvy kyseliny šťavelové dvou detektorů.

5.7. Stanovení organických kyselin v pivu

Stanovení organických kyselin v reálných vzorcích piva se provádělo pomocí UV detekce s předčištěním na kolonce SAX (obr. 3.). Tabulka 4 udává obsah aniontů organických kyselin ve vzorcích, které byly analyzovány výslednou metodou.

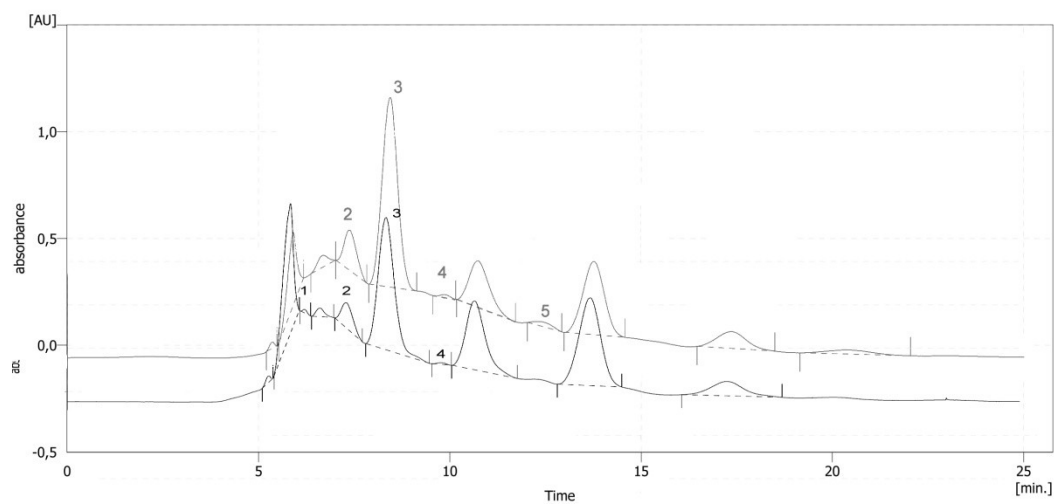
Tab. 10.: Retenční časy t_R studovaných organických kyselin a množství jejich aniontů (g/l) stanovované v reálných vzorcích.

Kyselina	t_R (min)	Gambrinus	Carlsberg	Birell
Šťavelová	6,42	–	0,027	0,014
Citronová	7,56	0,137	0,237	0,054
Jablečná	8,72	1,666	2,345	0,434
Jantarová	10,08	0,015	0,064	0,002
Mléčná	11,21	–	1,036	0,484
Octová	12,85	–	0,097	0,028

Tučné jsou označené hodnoty padající mimo lineární rozsah kalibrace.

Koncentrace kyseliny šťavelové v pivě Gambrinus a kyseliny jantarové v pivě Birell jsou mimo rozsah kalibrační křivky, ale jsou větší, než detekční limity.

Z velkou pravděpodobností tak velká koncentrace kyseliny jablečné souvisí s přítomností neznámé interferující látky, která koeluje s kyselinou jablečnou. Je známo, že kyselina jablečná koeluje s fruktosou, ale předčištěním vzorku na anexu zbavujeme se cukrů. Z druhého pohledu, kdyby nějaké malé množství fruktosy bylo přítomné v analyzovaném roztoku, toho by se nedalo určit z toho důvodu, že sacharidy neabsorbují elektromagnetické záření v UV oblasti.



Obr. 3. Chromatogram reálných vzorků (Gambrinus Original – černá čára, Carlsberg – šedá čára) získány pomocí UV detekce při vlnové délce 210 nm. Podmínky stanovení: mobilní fáze 0,01N kyselina sírová, průtoková rychlost 0,2 ml/min. Píky: (1) štavelová, (2) citronová, (3) jablečná, (4) jantarová, (5) octová.

6. Závěr

Stanovení organických kyselin ve vzorcích piva se provádělo HPLC metodou s předchozím předčištěním vzorku na silném iontovém měniči.

Jako nejvhodnější chromatografické podmínky byly zvolené následující parametry separace:

kolona	Eurokat H, 300x4 mm, 9um, Knauer
dávkovaný objem	10 ul
mobilitní fáze	0,01N kyseliny sírová
průtoková rychlost	0,2 ml/min
teplota kolony	75 °C
čas analýzy	25 minut
typ detekce	UV detekce při vlnové délce 210 nm

Šest hlavních organických kyselin, jmenovitě šťavelová, citronová, jantarová, jablečná, mléčná a octová, byly separovány na polární HPLC koloně a detekovány pomocí RI nebo UV detekce. Vzhledem k tomu, že limity detekce pro RI detektor byly větší, než pro UV, výhodou refraktometrické detekce je teoretická možnost současného stanovení organických kyselin a sacharidů.

Byly vyzkoušeny dva různé mechanismy SPE: extrakce na silném aniontovém iontoměniči (SAX) a extrakce na nepolárním sorbentu (CB). Bylo zjištěno, že lepší výtěžnost poskytuje předčištění vzorku na silném aniontu (80 – 110 %). Použití kolony CB se neosvědčilo, protože při aplikaci vzorku, kromě cukru, bylo zadržováno také dostatečné množství organických kyselin a výtěžnost činila 20 – 50 %.

Výsledná metoda (předčištění na SAX, UV detekce) byla vyzkoušena na reálných vzorcích piva a bylo zjištěno, že stanovení kyseliny jablečné může být narušeno neznámým interferentem. Koncentrace ostatních stanovovaných kyselin byly srovnatelné s hodnotami udávanými v literatuře. Výsledná metoda (předčištění na SAX, UV detekce) byla vyzkoušena na reálných vzorcích piva a bylo zjištěno, že stanovení kyseliny jablečné bylo narušeno neznámým interferentem

7. Bibliografické citace

- [1] Gomis, D. B.: HPLC Analysis of Organic Acids. In: *Food Analysis by HPLC*. 2nd ed. Leo M. L. Nollet (Ed.). New York, Basel: Marcel Dekker 1992, p. 477 – 492.
- [2] Galli, V., García, A., Saavedra, L., Barbas, C.: Review. Capillary electrophoresis for short-chain organic acids and inorganic anions in different samples. *Electrophoresis*, 24 (2003), p. 1951-1981.
- [3] Teyssen, S.; González-Calero, G.; Schimiczek, M.; Singer, M.V.: Malic acid and succinic acid in fermented alcoholic beverages are stimulants of gastric acid secretion. *The Journal of Clinical Investigation*, 5:103 (1999), p. 707 – 713.
- [4] Organische Säuren in Würze und Bier. In: *MEBAK Würze, Bier, Biermischgetranke*. 3rd ed. MEBAK 2010.
- [5] Santalad, A., Teerapornchaisit, P., Burakham, R., Srijaranai, S.: Capillary zone electrophoresis of organic acids in beverages. *LWT*, 40 (2007), p. 1741-1746.
- [6] *Beer in Health and Disease Prevention*. Viktor R. Preedy (Ed.). Elsevier 2009.
- [7] Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidoboro, J. F.: Review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38 (2005), p. 1175 - 1188.
- [8] Balgová, A.: Organoleptická stabilita piva. Bakalářská práce, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická (2011).
- [9] Nelson, E. K.: THE NON-VOLATILE ACIDS OF THE PEAR, QUINCE, APPLE, LOGANBERRY, BLUEBERRY, CRANBERRY, LEMON AND POMEGRANATE. *JOURNAL OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY*, 49, 5 (1927), p. 1300-1302.
- [10] Sádecká, J., Májek, P., Tóthová, J.: CE Profiling of Organic Acids in Distilled Alcohol Beverages Using Pattern Recognition Analysis. *CHROMATOGRAPHIA*, 67 (2008), p. 69-74.
- [11] Ying Sing Fung, Kap Man Lau: Analysis of organic acids and inorganic anions in beverage drinks by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 24 (2003), p. 3224-3232.
- [12] Klampfl, C. W.: Review. Determination of organic acids by CE and CEC methods. *Electrophoresis*, 28 (2007), p. 3362-3378.
- [13] Wai Siang Law, Jian Hong Zhao, Hauser, P. C., Sam Fong Yau Li: Capillary electrophoresis with capacitively coupled contactless conductivity detection for low molecular weight organic acids in different samples. *Journal of Separation Science*, 30 (2007), p. 3247-3254.

- [14] Masár, M., Kaniánsky, D., Bodor, R., Jöhnck, M., Stanislawski, B.: Determination of organic acids and inorganic anions in wine by isotachophoresis on a planar chip. *Journal of Chromatography A*, 916 (2001), p. 167 – 174.
- [15] Puchades, R., Herrereo, M.A., Maquieira, A., Atienza, J.: Simultaneous enzymatic determination of l(-) malic acid and l(+) lactic acid in wine by flow injection analysis. *Food Chemistry*, 42, 2 (1991), 167 - 182
- [16] Olson, G.F.: Optimal Conditions for the Enzymatic Determination of L-Lactic Acid. *Clinical Chemistry*, 8, 1 (1962), 1 - 10
- [17] Ming-Hua Yang, Youk-Meng Choong: A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂-C₁₂) volatile organic acids in foods. *Food Chemistry*, 75 (2001), p. 101-108.
- [18] Mato, I., Suárez-Luque, S., Huidobro, J. F.: A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *FOOD RESEARCH INTERNATIONAL*, 38 (2005), p. 1175-1188.
- [19] Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., Gallego, M.: Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. *Talanta*, 84 (2011), p. 924-930.
- [20] Mori, M., Ito, K.: Determination of Reductones, Furans and Organic Acids in Aqueous Model Matrices Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Food Science and technology Research*, 10, 1 (2004), p. 51 – 55.
- [21] De Backer, B. L., Nagels, L. J.: Potentiometric detection of organic acids in ion-exclusion chromatography using different type of liquid-membrane electrodes. *Analytica Chimica Acta*, 290 (1994), p. 259 – 267.
- [22] Zhu Yan, Zhang Xingde, Niu Weijun: Simultaneous determination of Carbohydrates and Organic Acids in Beer and Wine by Ion Chromatography. *Mikrochimica Acta*, 127 (1997), p. 189 – 194.
- [23] Wang, L. J., Schnute, B.: IC-MS Analysis of Low Molecular Mass Organic Acids in Beverages. *LC GC North America*, Sep 2008, p. 32-33.
- [23] Mancini, F., Miniati, E., Montanari, L.: DETERMINATION OF ORGANIC ACID ANIONS IN ITALIAN BEERS BY A NEW HPLC METHOD. *Italian journal of food science*, 4, 12 (2000).
- [24] Scherer, R., Poloni Rybka, A. C., Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Filho, J. T., Godoy, H. T.: Validation of HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*, 135 (2012), p. 150-154.
- [25] Castellari, M., Versari, A., Spinabelli, U., Galassi, S., Amati, A.: AN IMPROVED HPLC METHOD FOR THE ANALYSIS OF ORGANIC ACID, CARBOHYDRATES, AND

- ALCOHOLS IN GRAPE MUSTS AND WINES. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23, 13 (2000), p. 2047-2056
- [26] Cunha, S. C., Fernandes, J. O.: HPLC/UV determination of organic acids in fruit juices and nectars. *European food research and technology*, 214 (2002), p. 67 – 71.
 - [27] Pérez-Ruiz, T., Martínez-Lozano, C., Tomás, V., Martín, J.: Highperformance liquid chromatographic separation and quantification of citric, lactic, malic, oxalic and tartaric acids using a post-column photochemical reaction and chemiluminescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1026 (2004), p. 57 – 64.
 - [28] Amelin, V. G., Podkolzin, I. V., Tretiakov, A. V.: Determination of Organic Acids in Alcoholic and Nonalcoholic Beverages by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Analytical Chemistry*, 67, 3 (2012), p. 262–268.
 - [29] Jau-Tien Lin, Shih-Chuan Liu, You-Cheng Shen, Deng-Jye Yang: Comparison of Various Preparation Methods for Determination of Organic Acids in Fruit Vinegars with a Simple Ion-Exclusion Liquid Chromatography. *Food Analytical Research*, 4 (2011), p. 531 – 539.
 - [30] Eyéghé-Bickong, H. A., Alexandersson, E. O., Gouws, L. M., Young, P. R., Vivier, M. A.: Optimisation of an HPLC method for the simultaneous quantification of the major sugars and organic acids in grapevine berries. *Journal of Chromatography B*, 885-886 (2012), p. 43-49.
 - [31] Huopalahti, R., Järvenpää, E. P., Katina, K.: A NOVEL SOLID-PHASE EXTRACTION-HPLC METHOD FOR THE ANALYSIS OF ANTHOCYANIN AND ORGANIC ACID COMPOSITION OF FINNISH CRANBERRY. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 23, 17 (2000), p. 2695-2701.
 - [32] Eurokat brochure. [cit. 11.05.2013, on-line: http://www.knauer.net/fileadmin/user_upload/produkte/files/Dokumente/columns/lc_columns/brochures/b_e_co_eurokat_org_solvent-free_columns.pdf]
 - [33] Oberdorfer, F., Kemper, K., Kaleja, M., Reusch, J., Gottschall, K.: Carbohydrate analysis with ion chromatography using Eurokat stationary phases: Preparative separation of monosaccharides and their fluorinated derivatives. *Journal of Chromatography A*, 552 (1991), p. 483-487.
 - [34] McGinley, M., Nguyen, N., Mott, J.: Real-Time Response to Bacteria Infection of Bioethanol Fermentation Using a Short Rezex™ ROA Column. *THE APPLICATION NOTEBOOK*, Sep 1, 2008.
 - [35] Pavarina, E. C., Durrant, L. R.: Growth of Lignocellulosic-Fermenting Fungi on Different Substrates Under Low Oxygenation Conditions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 98 – 100 (2002), p. 663 – 678.